朱砂叶螨热激蛋白 HSP70 基因 *TCHSP70-4* 的克隆与表达

李　明，卢文才，冯宏祖，袁　亮，王进军，何　林*

（西南大学植物保护学院，重庆市昆虫学及害虫控制工程重点实验室，重庆　400716）

摘要：为了研究朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus*（Boisduval）热激蛋白 HSP70 的表达与其适应高温和低温胁迫的关系，我们利用物种的同源性及 RACE 技术，获得朱砂叶螨热激蛋白 HSP70 基因 1 个，命名为 *TCHSP70-4*（GenBank 登录号为 EU977182）。该基因全长 2 182 bp，包含 1 959 bp 的开放阅读框，编码 653 个氨基酸，理论分子量为 70.9 kDa，等电点为 5.4，含有 HSP70 家族高度保守的基序。运用 real-time PCR 分析冷激（4℃）和热激（40℃）1 h 后 *TCHSP70-4* 在朱砂叶螨体内的表达量。结果显示冷激后 *TCHSP70-4* 表达量明显下降，而热激后 *TCHSP70-4* 表达量却明显上升。这些结果一方面表明该基因属于诱导型 HSP70 基因，另一方面揭示了朱砂叶螨分别受到冷和热胁迫后体内 *TCHSP70-4* 的表达及所起的保护作用是不同的。

关键词：朱砂叶螨；热激蛋白；HSP70 基因；克隆；表达；温度胁迫；实时定量 PCR

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2008)12-1235-09

Cloning and expression analysis of a heat shock protein 70 gene *TCHSP70-4* from *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae)

LI Ming，LU Wen-Cai，FENG Hong-Zu，YUAN Liang，WANG Jin-Jun，HE Lin*（Key Laboratory of Entomology and Pest Control Engineering，College of Plant Protection，Southwest University，Chongqing 400716，China）

Abstract: In order to study the correlation between the expression of heat shock protein 70 (HSP70) and the adaptation to high and low temperature stress of *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval), the cDNA of a HSP70 gene named *TCHSP70-4* was cloned by using the species homology and technique of rapid amplification of cDNA end (RACE) from carmine spider mite. The full-length of *TCHSP70-4* cDNA (GenBank accession no.: EU977182) was 2 182 bp and the open reading frame (ORF) was 1 959 bp encoding a polypeptide of 653 amino acids, with an estimated molecular mass of 70.9 kDa and an estimated isoelectric piont (pI) of 5.40. It contained the highly conserved functional motifs of the HSP70 family. Comparative quantitative real-time RT-PCR was used to analyze the expression of *TCHSP70-4* gene after the treatments of cold shock (4℃) and heat shock (40℃) for 1 h, respectively. The results showed that the mRNA expression of *TCHSP70-4* was significantly down-regulated after cold shock and significantly up-regulated after heat shock. The result of *TCHSP70-4* gene expression, on one hand, revealed that the gene is of induced HSP70 gene; on the other hand, it also revealed that its expression and protective effect were different after cold stress and heat stress.

Key words: *Tetranychus cinnabarinus*; heat shock protein; HSP70 gene; cloning; expression; temperature stress; real-time PCR

朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus*（Boisduval）是一种重要的经济害螨，可危害温室和农田里的 100 多种作物（Hazan *et al*.，1974；Ho *et al*.，1997），通常仅需一周的时间就可以从卵发育至成螨。该螨喜高温干燥环境，在高温干燥的年份常猖獗危害成灾，并且具有忍受大范围温度变化的能力（Helle and

基金项目：国家自然科学基金项目（30600059）；公益性行业（农业）科研专项经费项目（NYHYZX 07-057）

作者简介：李明，男，1983 年生，云南个旧人，硕士研究生，主要从事害虫抗药性分子毒理学研究，E-mail：piaopiaogg@yahoo.cn

*通讯作者 Author for correspondence，E-mail：helinok@tom.com

收稿日期 Received：2007-11-06；接受日期 Accepted：2008-08-12

Sabeles，1985；Veerman，1985；何林等，2005）。

热激蛋白（heat shock protein，HSP）是细胞或生物体在受热或受病原体及其他理化因素等刺激后，所产生的一类在生物进化中最保守的蛋白（Christine *et al*.，2002；Hsu *et al*.，2003；Robert 2003；Neal *et al*.，2004）。根据 HSP 分子量大小及功能主要分为 5 个家族：小分子量 HSP 家族（small HSP）；HSP60 家族；HSP70 家族；HSP90 家族和 HSP110 家族（Parsell and Lindquist，1993；Moseley，1997；Borkan and Gullans，2002），其中 HSP70 家族是最保守也是研究得最为广泛的家族。

HSP70 家族包含两种不同的类型（Boorstein *et al*.，1994；Karlin and Brocchieri，1998），第一类是 HSP70，通常情况下在细胞内表达量很少，但在热应激或其他应激原的作用下，表达迅速增加，属于诱导型 HSP70；第二类是热应激同源蛋白 70（heat shock cognate protein 70，HSC70），是细胞内的结构蛋白，在所有的细胞内均能表达，但是并不受外界刺激的诱导，如热激或冷激（Kiang and Tsokos，1998），属于结构型 HSP70。

在自然界中，所有的生物都必须面对环境和生理的压力。因此，为了生存，生物体就必须产生一系列的保护机制来适应这些压力，诱导相关蛋白质（如 HSP70）的合成就是其中之一。不少研究结果已经证实 HSP70 在生物体获得热忍耐力中起了重要作用（Krebs，1999；Lansing *et al*.，2000；Denlinger *et al*.，2001；Sørensen *et al*.，2003）。而且，HSP70 对胁迫因子（高温、缺氧、辐射、重金属等）的耐受现象具有交叉性，即一种胁迫因子诱导机体表达 HSP70 后，机体对其他胁迫的耐受性也同样增加（Sanders *et al*.，1992；Leignel *et al*.，2007）。如朱砂叶螨在长期适应高温胁迫后，对阿维菌素的抗性显著增强（刘开林等，2007）。为了研究 HSP70 表达与朱砂叶螨适应高温和低温胁迫的相关关系，我们对克隆获得的 4 个 HSP70 基因之一，进行了测序和序列分析，并利用相对实时定量 PCR 检测体系，检测了热激和冷激胁迫对其表达的影响。

1 材料与方法

1.1 供试朱砂叶螨

朱砂叶螨采自重庆北碚地区，在重庆北碚西南大学植物保护学院人工气候室已饲养 5 年，供试寄主为新鲜盆栽豇豆苗 *Vigna sesquipedalis* Koern，饲养条件为 26 ± 1℃，相对湿度为 55% ~ 70%，光照周期 14:10（L:D）。

1.2 主要试剂

Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司，M-MLV 反转录试剂盒、纯化试剂盒、TaqDNA 聚合酶、dNTP、pMD-18T easy vector 连接试剂盒及荧光定量试剂盒购自 TaKaRa 公司，RACE 试剂盒（BD SMART RACE cDNA Amplification Kit）为 Clontech 公司产品。

1.3 总 RNA 的提取及第一链 cDNA 的合成

取 200 头朱砂叶螨雌成螨于玻璃匀浆器中匀浆，采用 Trizol 试剂盒进行总 RNA 提取，所有操作均按照试剂盒说明书进行。第一链 cDNA 的合成采用 TaKaRa 反转录试剂盒，操作均按照试剂盒说明书进行。

1.4 引物设计和 PCR 反应

根据 HSP70 家族保守区域，利用 Primer 5.0 设计简并引物，克隆出朱砂叶螨 HSP70 的 cDNA 片段后，利用 RACE（rapid amplification of cDNA ends）扩增 HSP70 的 5′和 3′端序列，最后依据 5′和 3′端的非编码区序列设计全长引物扩增 cDNA 全长，本研究所使用的 PCR 反应引物见表 1。

表 1 用于扩增朱砂叶螨 HSP70 基因的简并引物和 RACE 特异引物

Table 1 The degenerate primers and specific primers for cloning HSP70 gene of *Tetranychus cinnabarinus*

引物 Primer	序列 Sequences（5′－3′）
简并引物 Degenerate primer	F：CCNGARGARATHWSNGCNATGGT
	R：TANGCNACNGCYTCRTCNGGRTT
3′RACE 特异引物 3′RACE specific primer	F：CAATGAAATTGTACTGGTTGGAGGCT
	F：GAAATTGTACTGGTTGGAGGCT
3′RACE 接头引物 3′RACE adapter primer	R：CTGATCTAGAGGTACCGGATCC
5′RACE 特异引物 5′RACE specific primer	R：ACGAAGAGCTTTCTCGACTGGGTC
	R：CAAGTATGCTTCGGCGGTTTC
5′RACE 接头引物 5′RACE adapter primer	F：AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
全长引物 Full-length primer	F：AGAATCAGATTCAAACGTTGT
	R：AAAGAGCAACAGATCTAATCT
定量引物 Real-time PCR primer	F：TGCTCAGACCTGTTCCGATCAACA
	R：CTGCACCGTAAGCAACAGCTTCAT
β-actin（内参）引物 Reference gene specific primer	F：GCCATCCTTCGTTTGGATTTGGCT
	R：TCTCGGACAATTTCTCGCTCAGCA

片段扩增体系如下：0.2 μg cDNA，3.5 mmol/L $MgCl_2$，0.2 mmol/L dNTPs，各 0.4 μmol/L 上游和下游引物，2 个单位的聚合酶，配成 50 μL 体系。94℃ 3 min 预变性后变性 30 s，55℃退火 40 s，72℃延伸 1 min，共 35 个循环后，72℃延伸 10 min。5′和 3′端扩增采用半巢式 PCR 技术，扩增条件参照 RACE 试剂盒说明书进行。cDNA 全长扩增体系和片段扩增体系相同，PCR 扩增条件如下：94℃ 3 min 预变性后 30 s 变性，50℃退火 40 s，72℃延伸 2 min，共 35 个循环后，72℃延伸 10 min。

1.5　PCR 产物的克隆与测序

PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后用 DNA 纯化试剂盒纯化回收，克隆于 pMD-18T 载体上，再转化到大肠杆菌(JM109)内，送上海英骏生物技术有限公司进行测序。

1.6　序列分析及同源性比较

Blast P 同源性搜索在 NCBI 网站进行，用 DNAMAN 序列分析软件进行序列及同源性分析，绘制 HSP70 系统发育树。

1.7　利用 real-time PCR 测定冷激和热激后 *TCHSP70-4* 的相对表达量

以正常温度(26 ± 1℃)下饲养的朱砂叶螨种群为对照，从该对照种群中分别取 200 头雌成螨进行 1 h冷激(4℃)和热激(40℃)，室温恢复 30 min，利用上海英骏公司的无 DNA 污染的 RNA 提取试剂盒提取 RNA，用 TaKaRa 反转录试剂盒反转录合成第一链 cDNA，共重复 3 次。

我们前期的研究已经成功克隆出朱砂叶螨 *β-actin* 基因片段(GenBank 登录号：ABV82698)，并已通过 real-time PCR 证明 *β-actin* 可用于朱砂叶螨定量分析。因此，以 *β-actin* 基因为内参，利用荧光定量分析仪 Mx3000P(Stratagene)对冷激和热激后朱砂叶螨体内 HSP70 基因的表达量进行定量分析，反应体系如下：2 μg cDNA，上下游引物(表 1)各 0.2 μmol/L，0.5 μL ROX Reference Dye Ⅱ(50 ×)，12.5 μL 2 × SYBR® Premix Ex Taq™(TaKaRa)和 9.0 μL ddH_2O；反应条件如下：95℃预变性 10 s，95℃ 5 s，60℃ 20 s，共 45 个循环；95℃ 30 s，58℃ 30 s，95℃ 30 s 用于产生溶解曲线来判断是否产生单一扩增产物，产物的大小通过琼脂糖凝胶电泳检测，其中内参引物扩增片段长度为 113 bp，定量引物扩增片段长度为 199 bp；基因的相对表达量用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 方法(two-ddCt method)(Livak and Schmittgen，2001)进行计算，共 3 次重复。

1.8　统计分析

用 SPSS 12.0 分析软件 ANOVA 和 Duncan 多重比较测验来分析定量表达所得数据间的差异(P = 0.05 水平)。

2　结果与分析

2.1　朱砂叶螨热激蛋白 70 序列分析

PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察结果如图 1。经克隆获得朱砂叶螨热激蛋白 70 基因 1 个，命名为 *TCHSP70-4*(为我们获得的朱砂叶螨第 4 个 HSP70，其他另文发表)，核苷酸序列在 GenBank 中的登录号为 EU977182，cDNA 全长 2 182 bp，包括 1 959 bp 的开放阅读框，编码 653 个氨基酸(图 2)。推测其理论分子量为 70.9 kDa，等电点为 5.40；5′端非编码区长 106 bp，3′端非编码区长 117 bp，poly(A)加尾信号 AATAAA 位于 poly(A)上游 14 bp 处。

TCHSP70-4 推导的氨基酸序列包含 HSP70 家族 3 个完整的典型的基序(motif)：9 – 16 (IDLGTTYS)，197 – 210 (IFDLGGGTFDVSIL) 和 334 – 348 (IVLVGGSTRIPKIQK)。ATP-GTP 绑定基序位于 131 – 138；双组分核定位信号(KK 和 RRLRT)分别处于氨基酸的 250 – 251 及 261 – 265 位；细胞质中高度保守的 HSP70 C 末端标志性基序 EEVD 位于 648 – 651 之间(图 2)。

2.2　朱砂叶螨 TCHSP70-4 与其他物种 HSP70 进化树及比对分析

从 GenBank 中选择 12 种不同物种的细胞质 HSP70/HSC70 氨基酸序列，与 *TCHSP70-4* 基因编码的氨基酸序列一起构建 HSP70 系统发育树，结果表明，在选择的 12 种生物中，朱砂叶螨 HSP70-4 与同属于蜱螨目叶螨科的二斑叶螨的 HSC70 亲缘关系最近，这与其分类地位是一致的(图 3)。

根据进化树分析的结果，选取二斑叶螨 *T. urticae* HSC70、水生生物珍珠贝 *Pteria penguin* HSP70、昆虫意大利蜂 *Apis mellifera* HSP70、和哺乳动物鸭嘴兽 *Ornithorhynchus anatinus* HSP70 氨基酸序列，与从朱砂叶螨克隆获得的 *TCHSP70-4* 基因编码的氨酸序列进行比对分析。结果显示，*TCHSP70-4* 基因编码的氨基酸序列与二斑叶螨的 HSC70 氨基酸序列的相似性达到了 97%，与水生生物企鹅珍珠贝，昆虫意大利蜂，哺乳动物鸭嘴兽 HSP70 氨基酸序列的相似性分别为 83%，82%和 82%(图 4)。

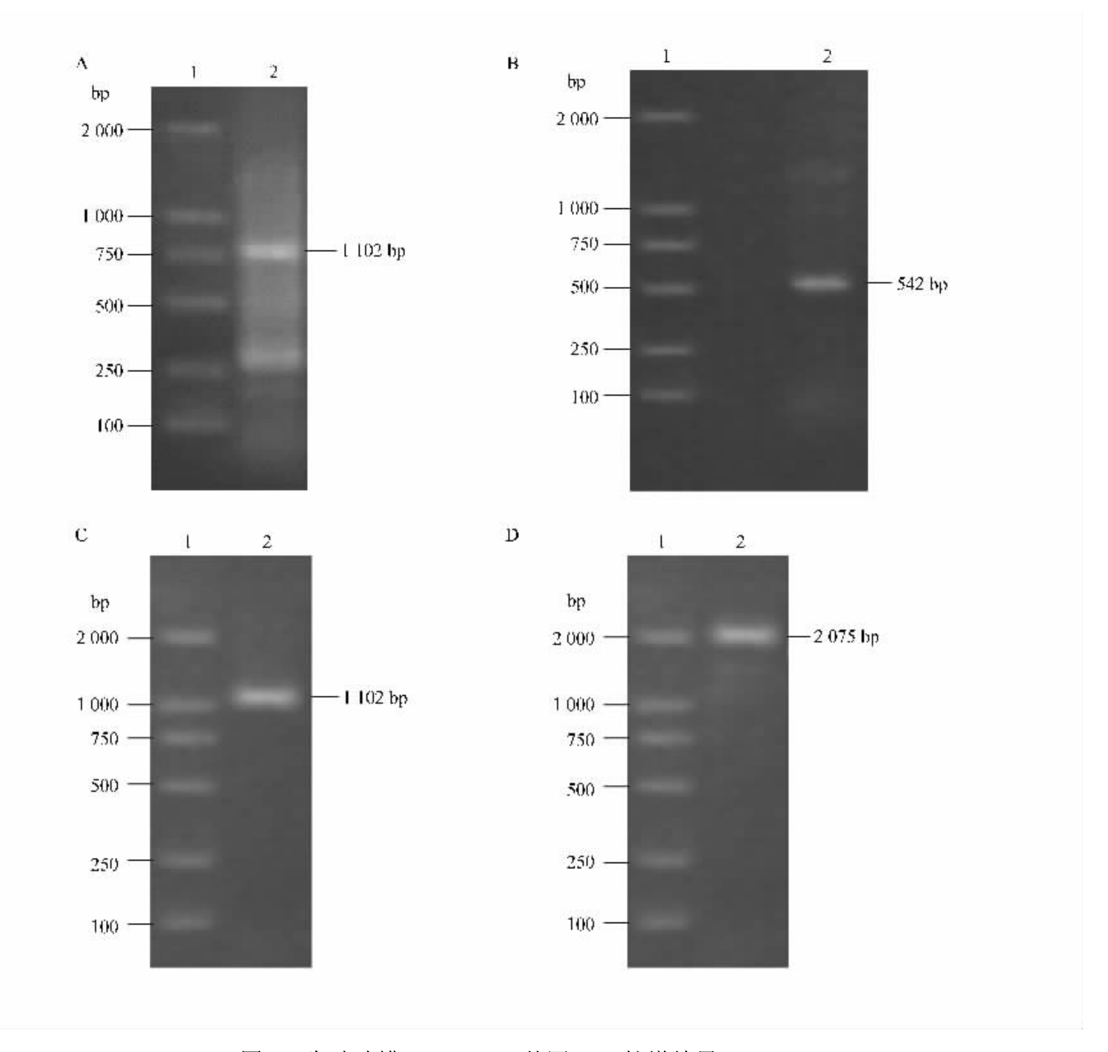


图 1 朱砂叶螨 *TCHSP70-4* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification result of *TCHSP70-4* gene in *Tetranychus cinnabarinus*

1：DNA 分子量标准 DNA maker（DL 2000）；2：扩增产物 Amplification products. A：简并引物扩增产物 Amplification product using degenerate primer；B：5′RACE 扩增产物 Amplification product using 5′RACE specific primer；C：3′RACE 扩增产物 Amplification product using 3′RACE specific primer；D：cDNA 全长扩增产物 Amplification product using full-length specific primer.

从图 4 还可以看出，各物种细胞质中 HSP70/HSC70 高度保守，尤其是 70 家族的 3 个特征区域，另外 N 端的保守性高于 C 端，C 端最后 150 个氨基酸变化很大，但是最后 4 个氨基酸“EEVD”则高度保守。

2.3 朱砂叶螨冷激、热激后 *HSP70-4* 的相对表达量

通过 real-time PCR 分析 *TCHSP70-4* 分别经过 1 h 的冷激和热激后的表达水平，结果表明：经 1 h 冷激后，朱砂叶螨 *TCHSP70-4* 相对表达量明显低于对照，仅为对照的 57.2%；经 1 h 热激后，*TCHSP70-4* 相对表达量明显高于对照，为对照的 1.728 倍（图 5）。

3 讨论

HSP70 家族在进化上高度保守，具有两个主要的结构域：N 端高度保守的 44 kDa 结构域，且是 ATP 的结合区，以及 C 端 25 kDa 的肽链识别结合区。其中 C 末端又可分成一个保守的 15 kDa 的多肽结合功能域和一个不保守的近 C 端 10 kDa 的可变区功能域（Flaherty *et al*.，1990；Kiang *et al*.，1998）。HSP70 家族包括诱导型 HSP70 和结构型 HSP70，大部分诱导型 HSP70 不含内含子，转录后不需要经过剪接加工，在应激状态下可优先表达（Kawamoto *et al*.，2007）。本研究克隆得到的 *TCHSP70-4* 基因结构分析表明：该基因编码的氨基

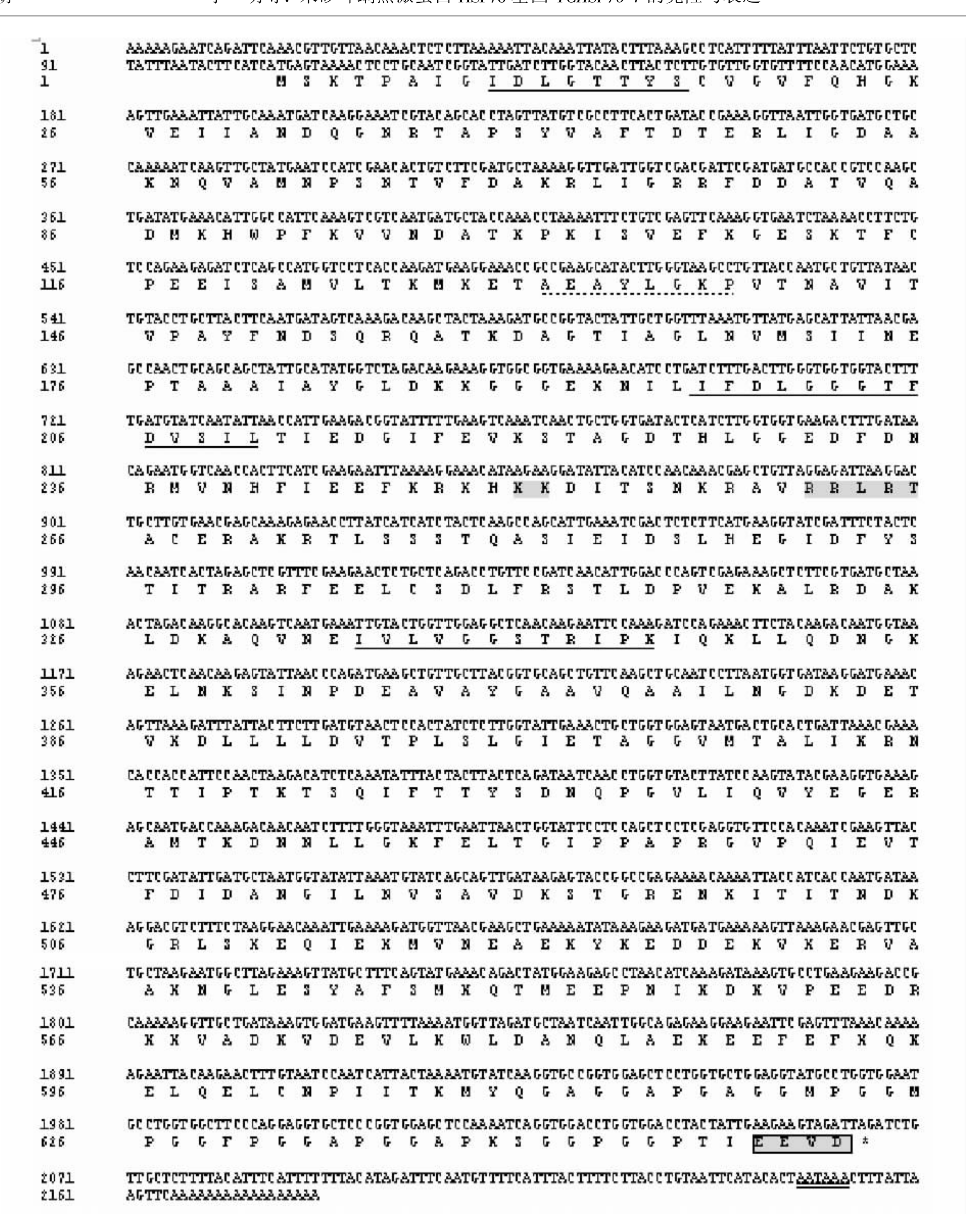


图 2　朱砂叶螨 *TCHSP70-4* 核苷酸和推导的氨基酸序列

Fig. 2　Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Tetranychus cinnabarinus TCHSP70-4*

HSP70 家族特征基序用下划线标出；ATP-GTP 绑定基序用下划点线标出；双组分核定位信号（KK 和 RRLRT）以灰色底纹显示；细胞质中高度保守的 HSP70 C 末端标志性基序“EEVD”用带框的灰色底纹显示，3′端非编码区 poly（A）加尾信号 AATAAA 用双下划线标出，* 表示终止密码子。The characteristic motifs of the HSP70 family were underlined. The putative ATP-GTP binding site motif was underlined with dots; a putative bipartite nuclear localization signal（KK and RRLRT）was shown in grey background and the cytoplasmic HSP70 carboxyl terminal region（EEVD）was shown in a grey box; the 3′ untranslated region that contains the consensus polyadenylation signal AATAAA was double-underlined. The stop codon was indicated with asterisk.

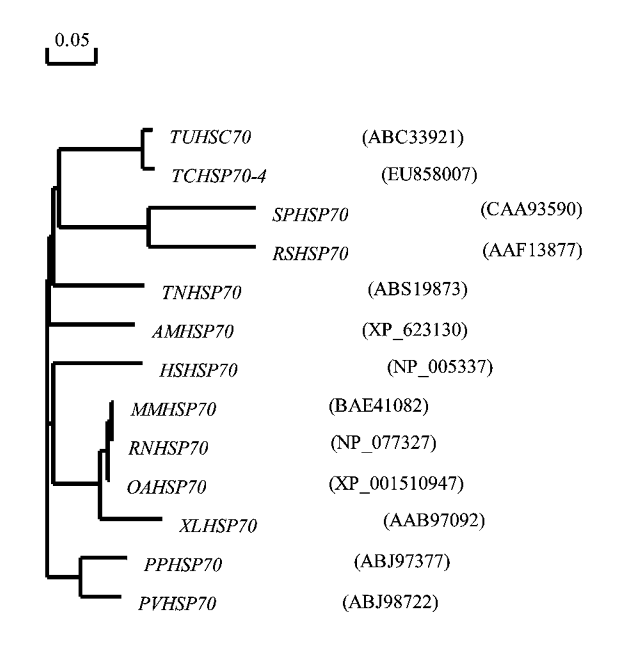


图3 采用最大可能性方法构建的细胞质HSP70系统进化树

Fig. 3 The phylogenetic tree of cytosolic HSP70 family members was constructed by the Maximum Likelihood Method

TUHSC70：二斑叶螨 *Tetranychus urticae* HSC70；*TCHSP70-4*：朱砂叶螨 *T. cinnabarinus* HSP70-4；*SPHSP70*：酵母 *Schizosaccharomyces pombe* HSP70；*RSHSP70*：葡枝根霉 *Rhizopus stolonifer* HSP70；*TNHSP70*：肌线虫 *Trichinella native* HSP70；*AMHSP70*：意大利蜂 *Apis mellifera* HSP70；*HSHSP70*：人 *Homo sapiens* HSP70；*MMHSP70*：小家鼠 *Mus musculus* HSP70；*RNHSP70*：褐家鼠 *Rattus norvegicus* HSP70；*OAHSP70*：鸭嘴兽 *Ornithorhynchus anatinus* HSP70；*XLHSP70*：光滑爪蟾 *Xenopus laevis* HSC70；*PPHSP70*：企鹅珍珠贝 *Pteria penguin* HSP70；*PVHSP70*：翡翠贻贝 *Perna viridis* HSP70. 所用物种HSP70氨基酸序列的GenBank登录号在括号中给出。GenBank accession numbers of HSP70 amino acid sequences were shown in brackets.

酸序列包含了 *HSP70* 基因家族3个典型的完整基序：*HSP70-1*（*PS00297*），*HSP70-2*（*PS00329*）和 *HSP70-3*（*PS01036*）（Ravaux *et al*.，2007），说明该基因属于 *HSP70* 基因家族；另外连续出现在C末端的四肽GGMP（M代表任意脂肪族的残基）以及出现在氨基酸末端的基序G-P-[TK]-[VI]-E-E-V-D说明该基因存在于细胞质中。

同源性分析显示TCHSP70-4氨基酸与其他物种细胞质中的HSP70氨基酸有很高的同源性，其中与亲缘关系最近的二斑叶螨最高，达到97%；而且与其他物种的比对结果表明，ATP结构域和底物结合结构域在所有物种中都十分保守，但C端结构域的保守性较低。造成C端结构域在进化过程中产生较大变异的原因，需要结合C端结构域的功能进一步研究。

通过实时荧光定量PCR技术研究 *TCHSP70-4* 分别经过1 h的冷激（4℃）和热激（40℃）的相对表达量（预备实验显示朱砂叶螨存活的极限低温和高温分别为4℃和40℃，有关存活率的数据未列出），结果表明冷激后 *TCHSP70-4* 的表达量明显低于对照，但热激后却明显高于对照，说明该基因属于诱导型的 *HSP70*。虽然经诱导后 *HSP70* 的表达量可以在1~1 000倍间变化（Lindquist，1986），但许多研究已发现1.5~4倍之间是有意义的诱导（Suntch *et al*.，1988；Requena *et al*.，1992；Qin *et al*.，2003）。*TCHSP70-4* 在热激后表达量是对照的1.728倍，介于1.5~4之间，属于有意义的诱导，同时也揭示该基因在朱砂叶螨适应热胁迫中具有某种重要功能，这与崔旭红等（2007）研究发现HSP70在B型烟粉虱抵抗高温胁迫方面可能具有重要作用的结论一致。已有研究表明：合成热激蛋白是一个能量消耗的过程（Koehn and Bayne，1989；Hoffmann，1995），并且通常的结果是以减少其他蛋白的合成为代价（Parsell and Lindquist，1993；Morimoto *et al*.，1994）。冷激后 *TCHSP70-4* 的表达量较对照有明显下降，我们推测，朱砂叶螨可能是以减少 *TCHSP70-4* 表达为代价合成其他种类的HSP以抵抗冷胁迫。

除 *TCHSP70-4* 外，我们从朱砂叶螨体内还获得了另外3个HSP70基因（*TCHSP70-1*，*TCHSP70-2* 和 *TCHSP70-3*），但其相对表达方面的测定工作还未完成，关于这3个基因的表达变化与朱砂叶螨适应温度胁迫的相关关系的研究结果，我们将另文报道。

在不同的环境条件（如冷、热）胁迫下，生物体内最明显的生理变化之一是HSP表达量的变化。HSP70主要功能是充当分子伴侣，与多种蛋白相互作用。这不仅有助于维持逆境下蛋白的折叠能力和保持其正确的折叠状态，还能协助降解机体内的错误折叠或变性蛋白，从而避免细胞受损失。HSP是当今生物抗逆生理学的一个重要研究内容，朱砂叶螨 *TCHSP70-4* 基因的成功克隆以及分别在4℃和40℃处理1 h后表达量差异的测定，不但为今后进一步研究该基因在不同处理温度、时间以及不同螨态表达量的变化情况提供依据，而且为深入研究朱砂叶螨适应高温胁迫的机理奠定了基础。当然，HSP是一个基因家族，朱砂叶螨对逆境高温或低温的适应不会只由一条HSP基因的表达变化诱导完成，因此，其他HSP基因，尤其是HSP70基因的时空表达动态变化与朱砂叶螨抗逆性的相关关系还需要进一步深入研究。

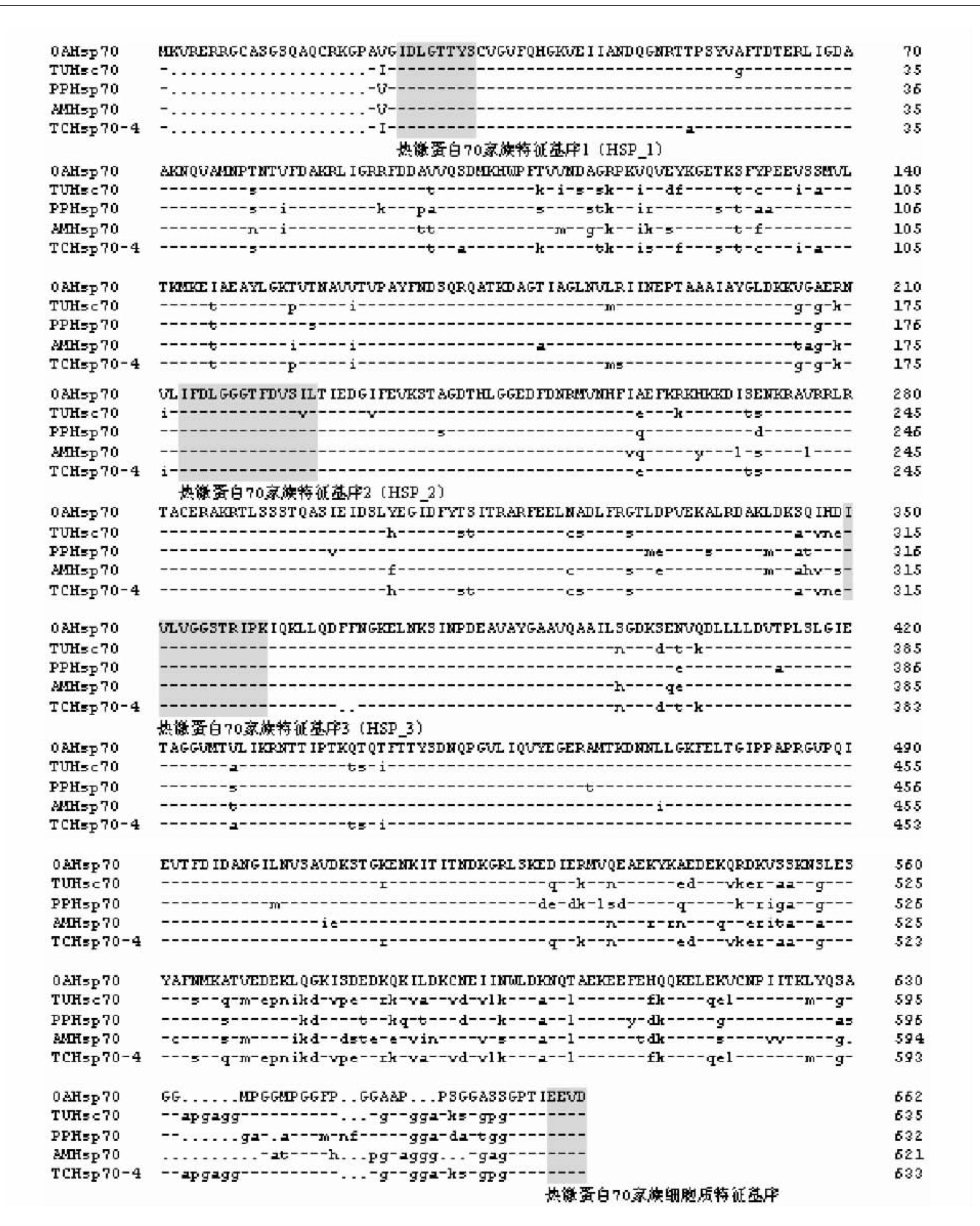


图 4　不同物种 HSP70/HSC70 氨基酸序列相似性比较

Fig. 4　Alignments of the amino acid sequence similarity of HSP70/HSC70 from different species

PPHSP70：珍珠贝 HSP70 *Pteria penguin* HSP70；OAHSP70：鸭嘴兽 HSP70 *Ornithorhynchus anatinus* HSP70；AMHSP70：意大利蜂 HSP70 *Apis mellifera* HSP70；TUHSC70：二斑叶螨 HSP70 *Tetranychus urticae* HSP70；TCHSP70-4：朱砂叶螨 HSP70-4 *T. cinnabarinus* HSP70-4. 特征基序以灰色显示。Typical motifs were shown in a grey box.

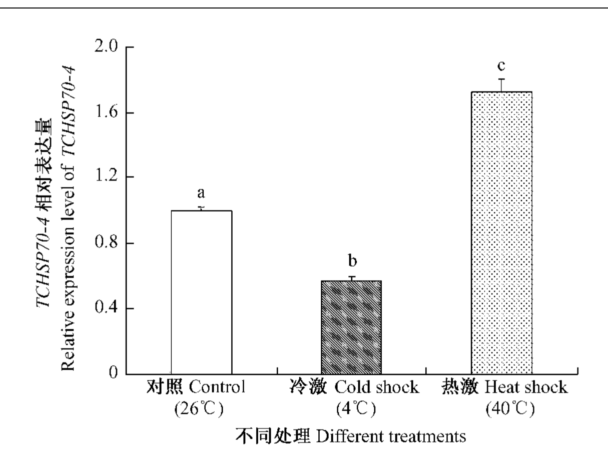


图5 朱砂叶螨冷激和热激1 h后 *TCHSP70-4* 基因的相对表达量

Fig. 5 The relative expression level of *TCHSP70-4* of *Tetranychus cinnabarinus* after 1 h heat shock and cold shock

图中数据为平均值±标准差(n=3),柱形图上的不同字母表示差异的显著性($P<0.05$)。Values are expressed as mean ± *SD* (n=3), different letters above each bar indicate statistical difference ($P<0.05$).

参 考 文 献(References)

Borkan SC, Gullans SR, 2002. Molecular chaperones in the kidney. *Annu. Rev. Physiol.*, 64: 503–527.

Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA, 1994. Molecular evolution of the Hsp70 multigene family. *J. Mol. Evol.*, 38: 1–17.

Christine Q, Todd AS, Susan L, 2002. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature*, 417(6 889): 598–599.

Cui XH, Xie M, Wan FH, 2007. Changes in expression level of heat shock protein 70 gene in *Bemisia tabaci* B-biotype (Homoptera: Aleyrodidae) under high temperature stress. *Acta Entomol. Sin.*, 50(11): 1 087–1 091. [崔旭红,谢明,万方浩,2007. 高温胁迫下B型烟粉虱热激蛋白基因HSP 70表达量的变化. 昆虫学报,50(11): 1 087–1 091]

Denlinger DL, Rinehart JP, Yocum GD, 2001. Stress proteins: A role in insect diapause? In: Denlinger DL, Saunders DS eds. Insect Timing: Circadian Rhythmicity to Seasonality. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 155–171.

Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C, McKay DB, 1990. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70 K heat-shock cognate protein. *Nature*, 346: 623–638.

Hazan A, Gerson U, Tahori AS, 1974. Spider mite webbing. I. The production of webbing under various environmental conditions. *Acarologia*, 16: 68–84.

He L, Zhao ZM, Cao XF, Deng XP, Wang JJ, 2005. Effect of temperature on development and fecundity of resistant *Tetranychus cinnabarinus* (Boiduval). *Acta Entomol. Sin.*, 48(2): 203–207. [何林,赵志模,曹小芳,邓新平,王进军,2005. 温度对抗性朱砂叶螨发育和繁殖的影响. 昆虫学报,48(2): 203–207]

Helle W, Sabeles MW, 1985. Spider Mites: Their Biology, Natural Enemies and Control. World Crop Pests, Vol. A. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 279–316.

Ho CC, Lo CC, Chen WH, 1997. Spider mites (Acari: Tetranychidae) on various crops in Taiwan. *Journal of Agricultural Research of China*, 46: 333–346.

Hoffmann AA, 1995. Acclimation: increasing survival at a cost. *Trends Ecol. Evol.*, 10: 1–2.

Hsu AL, Murphy CT, Kenyon C, 2003. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science*, 300(5 628): 2 033.

Karlin S, Brocchieri L, 1998. Heat shock protein 70 family: Multiple sequence comparisons, function, and evolution. *J. Mol. Evol.*, 47: 565–577.

Kawamoto Y, Akiguchi I, Shirakashi Y, Honjo Y, Tomimoto H, Takahashi R, Budka H, 2007. Accumulation of Hsc70 and Hsp70 in glial cytoplasmic inclusions in patients with multiple system atrophy. *Brain Res.*, 1 136: 219–227.

Kiang JG, Tsokos GC, 1998. Heat shock protein 70 kDa: Molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol. Ther.*, 80: 183–201.

Koehn RK, Bayne BL, 1989. Towards a physiological and genetical understanding of the energetics of the stress response. *Biol. J. Linn. Soc.*, 37: 157–171.

Krebs RA, 1999. A comparison of Hsp70 expression and thermotolerance in adults and larvae of three *Drosophila* species. *Cell Stress Chaperon.*, 4: 243–249.

Lansing E, Justesen J, Loeschcke V, 2000. Variation in the expression of Hsp70, the major heat-shock protein, and thermotolerance in larval and adult selection lines of *Drosophila melanogaster*. *J. Therm. Biol.*, 25: 443–450.

Leignel V, Cibois M, Moreau B, Chenais B, 2007. Identification of new subgroup of HSP70 in Bythograeidae (hydrothermal crabs) and Xanthidae. *Gene*, 396: 84–92.

Lindquist S, 1986. The heat shock response. *Annu. Rev. Biochem.*, 55: 1 151–1 191.

Liu KL, He L, Liao YL, Zhang JP, Wang JJ, Zhao ZM, 2007. The impact of high temperature and abamectin to *Tetranychus cinnabarinus* (Boiduval) and expression of heat shock protein. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 23: 249–253. [刘开林,何林,廖应林,张建平,王进军,赵志模,2007. 高温和阿维菌素对朱砂叶螨的胁迫效应及热休克蛋白研究. 中国农学通报,23: 249–253]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta *C*(*T*)) method. *Methods*, 25: 402–408.

Moseley PL, 1997. Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. *J. Appl. Physiol.*, 83(5): 1 413–1 417.

Neal F, Gordon NF, Clark B, 2004. Heat shock proteins and immune response: The challenges of bringing autologous HSP-based vaccines to commercial reality. *Methods*, 2(1): 63–69.

Parsell DA, Lindquist S, 1993. The function of Heat shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 27: 437–496.

Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C, 1994. The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones. Cold Spring Harbor

Laboratory Press，New York. 457 – 494.

Qin W，Tyshenko MG，Wu BS，Walker VK，Robertson RM，2003. Cloning and characterization of a member of the hsp 70 gene family from *Locusta migratoria*，a highly thermotolerant insect. *Cell Stress Chaperon*，8：144 – 152.

Ravaux J，Toullec JY，Leger N，2007. First hsp70 from two hydrothermal vent shrimps，*Mirocaris fortunata* and *Rimicaris exoculata*：Characterization and sequence analysis. *Gene*，386：162 – 172.

Requena JM，Jimenez-Ruiz A，Soto M，1992. Regulation of hsp70 expression in *Trypanosoma cruzi* by temperate and growth phase. *Mol. Biochem. Parasit.*，53：201 – 211.

Robert J，2003. Evolution of heat shock proteins and immunity. *Dev. Comp. Immunol.*，27：449 – 464.

Sanders BM，Pascoe VM，Nakagawa PA，1992. Persistence of the heat shock response over time in the common mussel，*Mytilus edulis*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*，1：147 – 155.

Snutch TP，Heschlm FP，Baillie，DL，1988. The *Caenorhabditis elegans* hsp70 gene family：A molecular genetic characterization. *Gene*，64：241 – 255.

Sørensen JG，Kristensen TN，Loeschcke V，2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.*，6：1 025 – 1 037.

Veerman A，1985. Photoperiodic termination of diapause in spider mites. *Nature*，266：526 – 527.

（责任编辑：邓艳）